

Veterinär-Anatomisches Institut der Universität Zürich  
(Direktor: Prof. Dr. Hans Geyer)

Arbeit unter der Leitung von PD Dr. H. Augsburg

# **Immunhistochemische Untersuchung von Kollagen Typ I, III und IV sowie $\alpha$ -Aktin im Uterus nulli- und multiparer Hündinnen**

## **INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät  
Universität Zürich

vorgelegt von Daniela Henzi  
Tierärztin  
von Günsberg SO und Zürich

Genehmigt auf Antrag von  
PD Dr. H. Augsburg, Referent  
Prof. Dr. F. Ehrensperger, Korreferent  
Zürich 2006

*Meinen Eltern in Liebe gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	2
3. Einleitung	3
4. Grundlagen der Anatomie und Histologie	4
4.1. Embryologie	4
4.2. Makroskopische Anatomie	4
4.3. Mikroskopische Anatomie	5
5. Kollagen und Aktin	7
5.1. Kollagenstruktur und –synthese	7
5.2. Aktin der glatten Muskulatur	9
6. Material und Methoden	9
6.1. Tiere	9
6.2. Probenentnahme und Verarbeitung	10
6.3. Immunhistochemische Untersuchungen	10
6.4. Reaktionsprotokoll	12
6.4.1. Antikörper	12
6.4.2. Protokoll	12
6.4.3. Zusammenstellung der Demaskierungszeiten und Verdünnungen	13
7. Resultate	14
7.1. Kollagen I und III	14
7.1.1. Nullipare Hündinnen	14
7.1.2. Multipare Hündinnen	15
7.2. Kollagen IV	16
7.2.1. Nullipare Hündinnen	16
7.2.2. Multipare Hündinnen	16
7.3. Aktin	16
7.3.1. Nullipare Hündinnen	16
7.3.2. Multipare Hündinnen	17
8. Diskussion	22
8.1. Methodik	22
8.2. Resultate	23

8.2.1. Kollagen I und III	23
8.2.2. Kollagen IV	24
8.2.3. Aktin	26
8.2.4. Gefäße	26
8.3. Schlussfolgerungen	28
9. Literaturverzeichnis	30
10. Dank	38

## 1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von mindestens 7 durchgemachten Trächtigkeiten auf den Gehalt und das Verteilungsmuster von Kollagen Typ I, III und IV sowie  $\alpha$ -Aktin in den verschiedenen Kompartimenten der Uteruswand der Hündin zu analysieren. Von Interesse war ausserdem die Zusammensetzung der extrazellulären Matrixsubstanz der stark verdickten Intima der Uterusarterien im trächtig gewesenen Uterus. Dazu wurden Querschnitte aus dem mittleren Bereich der Uterushörner von je einer homogenen Gruppe von 6 nulliparen und 5 multiparen Hündinnen immunhistochemisch untersucht.

Die Kollagentypen I und III brachten die Kollagenfasern des Uterusstromas zur Darstellung. Sie wiesen ein nahezu identisches Verteilungsmuster auf, wobei die Reaktionsintensität von Kollagen III in der Regel stärker war als jene von Kollagen I. Als wesentliche Unterschiede zu den nulliparen wiesen die Uteri multiparer Hündinnen eine schmale, stark positive Schicht von feinen Kollagenfasern direkt unter dem Epithel des Endometriums sowie deutlich dünnere Bindegewebssepten im Stratum longitudinale des Myometriums auf.

Durch die Kollagen Typ IV-Reaktion wurden die Basalmembranen sichtbar. Sowohl bei nulli- wie auch bei multiparen Hündinnen waren die Basalmembranen des Uterusepithels und der Uterusdrüsen nur schwach positiv, während diejenigen der Blutgefässe und der glatten Muskelzellen des Myometriums intensiv reagierten.

Der Nachweis von  $\alpha$ -Aktin liess die glatte Muskulatur im Myometrium und in der Tunica media der Uterusarterien erscheinen. Im Vergleich zu den nulliparen Hündinnen war die Media der Uterusarterien bei den multiparen deutlich dünner und es waren nur noch einzelne schwach  $\alpha$ -Aktin-positive Muskelzellen nachweisbar.

Zwischen nulliparen und multiparen Hündinnen bestehen mit Ausnahme der sklerotisch veränderten Uterusarterien und der feinen Kollagenfaserschicht unter dem Uterusepithel multiparer Hündinnen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Verteilung, Lokalisation und Reaktionsintensität von Kollagen Typ I, III und IV sowie  $\alpha$ -Aktin. Trotz der massiven Auf-, Um- und Abbauvorgänge während der Trächtigkeit und der anschliessenden Involution unterscheidet sich demnach der trächtig gewesene Uterus bezüglich der nachgewiesenen Kollagentypen und des  $\alpha$ -Aktins nur geringfügig vom nicht trächtig gewesenen.

## 2. Summary

The purpose of this study was to examine the effect of at least 7 pregnancies on the content, localization and distribution of collagen type I, III and IV and  $\alpha$ -actin in the different compartments of the uterine wall. Furthermore, the composition of the extracellular matrix substance of the strongly thickened intima of the uterine arteries in the multiparous uterus was of interest. Therefore cross sections of the middle of the uterine horns of homogenous groups of 6 nulliparous and 5 multiparous dogs were examined immunohistochemically.

The immunohistochemical reaction of collagen type I and III visualized the collagen fibres of the uterine stroma. They showed almost identical distribution patterns whereas the reaction intensity of collagen III generally was stronger than that of collagen I.

In contrast to the nulliparous the multiparous uteri showed a thin strongly positive layer of fine collagen fibres directly underneath the endometrial epithelium as well as clearly thinner septae of connective tissue in the stratum longitudinale of the myometrium.

The collagen IV reaction depicted the basement membranes. The basement membranes of the uterine epithelium and the uterine glands were only weakly positive, while those of the bloodvessels and the smooth muscle cells of the myometrium reacted intensely in both the nulliparous and multiparous bitches.

The reaction of  $\alpha$ -actin showed the smooth musculature of the myometrium and the tunica media of the uterine arteries. In contrast to the nulliparous, the tunica media of the uterine arteries of the multiparous dogs was significantly thinner and only a few weakly  $\alpha$ -actin-positive muscle cells were detectable.

Between nulliparous and multiparous bitches no significant differences concerning the distribution, localization and reaction intensity of collagen I, III and IV as well as  $\alpha$ -actin existed except for the sclerotically altered uterine arteries and the fine layer of collagen fibres beneath the uterine epithelium of multiparous bitches.

Despite the intense remodelling during pregnancy and subsequent involution the multiparous uterus only differs slightly from the nulliparous uterus regarding the analysed collagen types and  $\alpha$ -actin.

### 3. Einleitung

Die weiblichen Fortpflanzungsorgane sind mit Eintritt der Geschlechtsreife ständig starken physiologischen und morphologischen Veränderungen ausgesetzt. Zyklus und Trächtigkeit sind komplexe Vorgänge, die bei verschiedenen Tierarten unterschiedliche morphologische Veränderungen zurücklassen. Der Uterus ist dabei durch die starke Grössenzunahme bis zur Geburt und die anschliessende Involution am stärksten beansprucht.

Der Zyklus der Hündin zeigt grosse rassespezifische und individuelle Unterschiede. Die Läufigkeit tritt meist zweimal im Jahr auf, die Oestrusintervalle schwanken jedoch zwischen 6 und 9 Monaten (Schnorr und Kressin, 2001). Im Vergleich zu andern Säugetieren haben Hunde einen deutlich verlängerten Zyklus, wobei insbesondere der Anöstrus mit 4 bis 6 Monaten sehr lange dauert.

Die durchschnittliche Tragzeit beträgt 63 Tage, wobei physiologische Schwankungen von 59 bis 68 Tagen vorkommen (Frewein et al. 1994). Anschliessend an die Geburt erfolgt die beim Hund 12 Wochen dauernde Involution des Uterus (Mc Entee, 1990). Das Wiederauftreten der Brunst erfolgt beim Hund etwa 5-6 Monate nach der Geburt.

Der trächtige Uterus ist einer starken physikalischen Belastung ausgesetzt und muss einer hohen Zugbelastung standhalten. Dabei spielt Kollagen, eines der wichtigsten Strukturproteine des Körpers, eine wichtige Rolle. Beim Rind vermehren sich vor allem die zugfesten Kollagen I-Fasern während der Trächtigkeit (Boos et al. 2003). Die absolute Kollagenmenge erhöht sich bis zur Geburt ebenfalls stark, wobei die relative Konzentration pro Gramm Gewebe leicht abnimmt (Kaidi et al. 1995). Bei der Hündin vermehren sich die Kollagenfasern während der Involution im Bereich des Plazentationsgürtels zunächst stark. Die Ablösung dieser Kollagenmassen ins Lumen leitet die Regeneration des Endometriums ein (Al-Bassam, 1981).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach dem Gehalt, der Lokalisation und der Verteilung von Kollagen Typ I, III und IV sowie Aktin im Uterus der Hündin. Von besonderem Interesse waren dabei allfällige Unterschiede zwischen nulli- und multiparen Hündinnen sowie die Zusammensetzung der extrazellulären

Matrixsubstanz in der bei multiparen Hündinnen stark verdickten Intima der Uterusarterien im Stratum vasculare des Myometriums.

## **4. Grundlagen der Anatomie und Histologie**

### **4.1. Embryologie**

Obwohl bei den Säugetieren bereits bei der Befruchtung das Geschlecht festgelegt wird, werden die Geschlechtsorgane zunächst indifferent angelegt.

Bei beiden Geschlechtern befinden sich auf jeder Seite zwei Geschlechtsgänge: der Urnieren- oder Wolffsche Gang (Ductus mesonephricus) sowie der Müllersche Gang (Ductus paramesonephricus).

Beim männlich determinierten Individuum entwickelt sich der Wolffsche Gang unter dem Einfluss von Testosteron zu Nebenhodenkanal, Samenleiter und Samenblasendrüse, während der Müllersche Gang durch die Wirkung des Müllerian Inhibiting Factor zurückgebildet wird (Schnorr und Kressin, 2001).

Beim weiblichen Embryo entwickeln sich aus den kranialen Abschnitten des Müllerschen Ganges die Eileiter, die beiden kaudalen Abschnitte vereinigen sich tierartlich unterschiedlich zum Uterovaginalkanal, der sich in einen paarigen und einen unpaarigen Teil gliedert. Durch die Ausbildung der Zervix im unpaaren Abschnitt wird der Uterovaginalkanal in Uterus und Vagina unterteilt.

Die Wolffschen Gänge bilden sich zurück (Schnorr und Kressin, 2001).

### **4.2. Makroskopische Anatomie**

Der Uterus gliedert sich beim Hund in die beiden Uterushörner (Cornua uteri), den Uteruskörper (Corpus uteri) und die Zervix (Cervix uteri).

Die ca. 1 cm lange Zervix schliesst den 2-3 cm langen Uteruskörper kaudal zur Vagina hin ab. Vom Corpus uteri ausgehend verlaufen die beim mittelgrossen Hund ca. 8-10 cm langen Uterushörner leicht gebogenen nach kraniodorsal Richtung Niere.



Der Uterus liegt beim Hund fast vollständig in der Bauchhöhle, nur die Zervix reicht nach kaudal in die Beckenhöhle hinein (Salomon et al. 2004).

Die Aufhängung besteht beidseits aus einer grossen Bauchfelddoppelplatte (Mesometrium), die aus dem dorsolateralen Teil der hinteren Bauchwand bzw. aus der vorderen Seitenwand der Beckenhöhle entspringt. Ueber das Mesometrium werden auch die Blutgefässe und Nerven an den Uterus herangeführt. Die beiden Serosalamellen trennen sich am Organ und überziehen es als Perimetrium (Nickel et al. 1999).

Die Blutversorgung des Uterus erfolgt über die Arteria uterina sowie den Ramus uterinus der Arteria ovarica. Der Lymphabfluss erfolgt über die Lnn. sacrales zu den Lnn. iliaci mediales und den Lnn. lumbales aortici (Frewein et al. 1994).

Im graviden Uterus bilden sich ab dem 18.-20. Tag post conceptionem sogenannte Fruchtkammern, die relativ gleichmässig auf beide Hörner verteilt sind.

Die zwischen den Fruchtkammern gelegenen Internodien werden durch die Uterusmuskulatur gebildet, die sich hier in einer Dauerkontraktion befindet.

Ab der 6. Woche verschwinden die Einschnürungen, die Uterushörner nehmen eine Schlauchform an und senken sich auf die ventrale Bauchdecke herab, wo sie sich ab der 7. Woche durch das rapide Wachstum der Welpen in Schlingen legen (Frewein et al. 1994).

Die Geburt erfolgt nach einer durchschnittlichen Tragzeit von 63 Tagen.

Die Rückbildung des Uterus (Involution) dauert bei der Hündin mit 12 Wochen deutlich länger als bei andern Säugetieren (Mc Entee, 1990).

### **4.3. Mikroskopische Anatomie**

Die Uteruswand besteht von innen nach aussen aus dem Endometrium, dem Myometrium und dem Perimetrium.

Das Endometrium wird von einem einschichtigen, hochprismatischen Oberflächenepithel und der aus zellreichem Bindegewebe und Uterindrüsen bestehenden Lamina propria mucosae gebildet (Salomon et al. 2004).

Das Myometrium besteht aus zwei Muskelschichten, wobei die äussere, das Stratum musculare longitudinale, aus spiralig-längsgerichteten, und die innere, das Stratum musculare circulare, aus spiralig-zirkulär angeordneten Muskelfaserzügen besteht.

Diese Anordnung erlaubt eine grosse Ausdehnung des Uterus während der Trächtigkeit (Frewein et al. 1994).

Beim nulliparen Uterus bildet das Stratum musculare longitudinale die Grundlage für eine antimesenteriale zipfelförmige Ausstülpung, welche als Reservefalte des Myometriums angesehen werden kann, die die Uterusvergrösserung während der ersten Trächtigkeit erleichtert und nach der ersten durchgemachten Trächtigkeit in der Regel nicht mehr sichtbar ist (Kürzi, 2003).

Zwischen den beiden Muskelschichten befindet sich das Stratum vasculare, welches für die Blutversorgung der gesamten Uteruswand zuständig ist.

Während der Trächtigkeit kommt es zu einer erheblichen Hypertrophie und –plasie der Muskelzellen und Bindegewebelemente. Der Durchmesser der Uterusgefässe nimmt zu und die Blutgefässe strecken sich mit zunehmender Trächtigkeitsdauer (Neider, 1957). Nach einer Trächtigkeit findet man zahlreichere und grössere Arterienanschnitte mit einem veränderten Wandaufbau: die Intima ist stark verdickt, die Media dafür wesentlich dünner und mit Bindegewebsfasern durchzogen. Dies wird als Trächtigkeitssklerose bezeichnet (Augsburger und Kürzi, 2004).

Das Perimetrium geht aus dem Mesometrium hervor und besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel und der Lamina propria, einer dünnen Bindegewebschicht mit zum Teil einzelnen elastischen Fasern. Nach einer Trächtigkeit erscheint das Perimetrium dicker und enthält mehr elastische Fasern (Kürzi, 2003).

Im Gegensatz zu andern Säugetieren besitzen die Fleischfresser eine gürtelförmige Placenta zonaria, die histologisch als Placenta endotheliochorialis klassifiziert wird (Schnorr und Kressin, 2001).

Die Uterusschleimhaut (Endometrium) zeigt zu Beginn der Trächtigkeit zunächst eine deutliche Hypertrophie und Hyperämie, flacht dann aber ab der 3. Woche ab und das Epithel wird an der Plazentationsstelle durch den Trophoblasten des Embryos zerstört und aufgelöst (Schnorr und Kressin, 2001). Zwischen den tiefen und den oberflächlichen Drüsen entsteht die Drüsendeckschicht, wobei sich die oberflächlichen Drüsen zu Drüsenkammern entwickeln. Lumenwärts befindet sich das aus chorialen und endometrialen Lamellen aufgebaute Plazentalabyrinth. Hier wird das Endometrium bis auf das Endothel der Gefässe abgebaut, wodurch es zu einem engen Kontakt zwischen den mütterlichen Kapillaren und dem Chorionepithel kommt.

Zwischen den Implantationskammern bleibt das Endometrium während der Trächtigkeit unverändert (Interplazenta). Am Uebergang (Paraplazenta) zwischen Interplazenta und Implantationskammer bilden sich durch die Eröffnung von maternalen Gefässen sogenannte Randhämatome (Schnorr und Kressin, 2001). Nach der Geburt wird alles Gewebe lumenwärts der Drüsendeckschicht als Dezidua abgestossen. Mikroskopisch erkennt man im Bereich der Plazenta eine starke, von der Lamina propria des Uterus ausgehende Vermehrung der Kollagenfasern, die grosse, gelappte Massen bilden. Nach ca. 4 Wochen haben diese Massen ihre maximale Ausdehnung erreicht und es kommt in der 5. Woche zu einer massiven Ablösung von Kollagen ins Lumen hinein (Al Bassam et al. 1981).

Die Regeneration des Endometriums erfolgt von der tiefen Drüsenschicht aus, Binde- und Drüsengewebe wird neu gebildet.

Die Epithelisierung der Wundfläche geht von der Paraplazenta aus (Schnorr und Kressin, 2001).

## 5. Kollagen und Aktin

### 5.1. Kollagenstruktur und –synthese

Als wesentlicher Bestandteil des Bindegewebes ist Kollagen (griech. Kolla = Leim) das häufigste Strukturprotein im Säugetier (ca 25% des Gesamtproteins). Es existieren mindestens 27 verschiedene Kollagentypen; die wichtigsten und häufigsten sind die Kollagen-Typen I-IV (Eyre et al. 2004).

Kollagen Typ I :	macht 90% des gesamten Körperkollagens aus und kommt hauptsächlich in Sehnen, Faszien , Knochen und im Stroma aller Organe sowie in Organkapseln, Dentin, Cornea und grossen Gefässen vor
Kollagen Typ II :	bildet Fibrillen im hyalinen Knorpel, im Faserknorpel und im Glaskörper des Auges
Kollagen Typ III :	bildet Retikulinfasern und kann mit andern Kollagentypen kopolymerisieren,

kommt in einigen Geweben als Lamina fibroreticularis unter der Basallamina, in lymphatischen Organen, Haut, Herzklappen, Gingiva, Darm, grossen Gefässen und Uteruswand vor

Kollagen Typ IV : bildet das Gerüst aller Basalmembranen (Basallaminae)

Kollagenfasern setzen sich aus Kollagenfibrillen zusammen. Diese sind aus Untereinheiten, dem Tropokollagen, aufgebaut. Das Tropokollagen besteht aus drei durch Wasserstoffbrücken verbundenen, umeinandergewundenen Polypeptid- $\alpha$ -Ketten (Proteinhelices).

Hauptproduzenten des Kollagens sind Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten sowie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fettzellen (Junqueira et al. 2002).

In den Fibroblasten erfolgt die Biosynthese der Kollagenfibrillen durch membrangebundene Ribosomen, an denen Polypeptid- $\alpha$ -Ketten mit einer typischen Sequenz gebildet werden. Diese enthalten Prolin, Lysin und Signalpeptide. Nach der Aufnahme der Polypeptidketten in die Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) werden die Signalpeptide abgespalten und Prolin sowie Lysin hydroxyliert. Ascorbinsäure ist dabei ein wichtiger Kofaktor. Anschliessend erfolgt die Anheftung von Zuckerresten (Glykosylierung) und die Verdrillung der  $\alpha$ -Ketten zu einer Tripelhelix, dem Prokollagen. Nach der Sekretion in den Extrazellulärraum werden die nicht-helikalen Anteile am C- und N-terminalen Ende des Prokollagens abgespalten, wodurch das Tropokollagen entsteht. Dieses lagert sich zunächst zu Mikrofibrillen zusammen, welche sich dann nach Oxidation der Lysilreste zu Kollagenfibrillen vernetzen. Darin ist das Tropokollagen parallel, aber versetzt angeordnet (Junqueira et al. 2002).

Die im Elektronenmikroskop sichtbare Querstreifung entsteht durch die Anlagerung von Schwermetallen an die nicht-helikalen Anfangs- und Endstücke des Tropokollagens (Junqueira et al. 2002).

Die Kollagenfaserbündel sind im Ruhezustand leicht gewellt und strecken sich unter Zug; sie tolerieren Zugbelastungen besser als Druck.

## 5.2. Aktin der glatten Muskulatur

Die glatte Muskulatur besteht aus spindelförmigen Zellen ohne Querstreifung, die Aktin-, Myosin- und Intermediärfilamente sowie einen zentral gelegenen länglichen Kern enthalten. Weiter weisen sie „Dense bodies“ auf, an denen die dünnen Aktin- und die Intermediärfilamente inserieren, wodurch die glatte Muskulatur in der immunhistochemischen Färbung zum Teil granuliert erscheint.

Aktin- und Myosinfilamente bilden in der glatten Muskulatur im Gegensatz zu der quergestreiften ein gitterförmiges Netzwerk. Ausserdem enthalten die Aktinfilamente der glatten Muskulatur anders als die der quergestreiften kein Troponin.

Ein weiterer wichtiger Unterschied besteht in der Regenerationsfähigkeit.

Skelettmuskulatur ist nur begrenzt regenerationsfähig. Als Quelle für neue Zellen dienen dabei Satellitenzellen, welche ruhende Myoblasten darstellen und durch einen Reiz zur Proliferation angeregt werden können. In glatter Muskulatur ist eine Regeneration durch Teilung der glatten Muskelzellen möglich. Die Fähigkeit zur Zellteilung ist auch im Uterus wichtig, wo es bei einer Trächtigkeit sowohl zu einer Hyperplasie (Zunahme der Zellzahl) als auch zu einer Hypertrophie (Vergrößerung durch vermehrten Aufbau von Myofibrillen) der glatten Muskulatur kommt (Junqueira et al. 2002).

## 6. Material und Methoden

### 6.1 Tiere

Die Untersuchungen wurden an zwei homogenen Gruppen von Beaglehündinnen durchgeführt. Die nullipare Gruppe bestand aus 6 geschlechtsreifen, noch nie trächtig gewesenen, die multipare aus 5 mindestens sieben Mal trächtig gewesenen Hündinnen. Die nulliparen Hündinnen waren zwischen 20 und 27 Monaten, die multiparen zwischen 8 und 9 Jahren alt.

Alle Hündinnen waren zum Zeitpunkt der Euthanasie gesund und befanden sich im Anöstrus; sie wogen zwischen 8.3 kg und 11.5 kg.

Die Euthanasie wurde mittels 7 ml Vetanarcol (Veterinaria AG, Zürich) i.v. durchgeführt.

Verschiedene Organe der Hündinnen wurden bereits für andere Untersuchungen verwendet (Kürzi, 2003; Augsburg und Eggenberger, 2005).

## **6.2. Probenentnahme und Verarbeitung**

Nach der Euthanasie wurde das Abdomen in der Linea alba eröffnet und der Uterus inklusive Zervix herauspräpariert. Mit einer Rasierklinge wurde von beiden Hörnern ein je 15 mm langes Stück aus der Mitte zwischen Uterusbifurkation und den Uterushornspitzen entnommen, während 24 Stunden in 4% Formalin immersionsfixiert und anschliessend einzeln in Paraffin eingebettet.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Proben mit einem Mikrotom (Leica RM 2165) in 5 µm dicke Querschnitte senkrecht zur Uteruslängsachse geschnitten und auf SuperFrost®plus-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, D) aufgezogen.

## **6.3 Immunhistochemische Untersuchungen**

Als Grundlage für die immunhistochemischen Reaktionsprotokolle diente die Dissertation von Oswald (2005) über Kollagen und Aktin in der Urethra der Hündin, wobei die Antikörpervedünnungen und auch die Demaskierungszeit zum Teil leicht variiert wurden, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Da keine caninen Antikörper gegen Kollagen zu erhalten sind, wurde ausschliesslich mit humanspezifischen gearbeitet.

Als Positivkontrollen wurden Schnitte von menschlichem Ureter sowie von Uterus und Niere eines Affen verwendet. Als Negativkontrolle dienten jeweils Uterusschnitte, welche statt mit Primärantikörper mit einer unspezifischen polyklonalen Immunglobulinlösung (Mouse bzw. Rabbit isotope control, Zymed, USA) inkubiert wurden.

Damit die immunhistochemische Reaktion überhaupt erfolgen konnte, mussten die Schnitte zunächst mit Xylol und Ethanol in abnehmender Konzentration

entparaffiniert und die Antigene danach mit Pepsin-HCl bei 37° C demaskiert werden, um die durch die Fixierung verursachte Beeinträchtigung der Immunreaktivität bestmöglich zu vermindern. Allerdings wird dabei auch endogenes Biotin „demaskiert“, was zu Hintergrundfärbung führen kann (Bönisch, 2003). Um diese zu vermindern wurden einige Schnitte vor der Zugabe des Primärantikörpers mit 4% Magermilchpulver in Tris buffered saline (TBS) (Rizk et al. 2003) resp. mit einem Avidin-Biotin-Block (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) inkubiert. Zuvor erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mittels 0.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol.

Die Färbung der Präparate erfolgte mittels einer indirekten 2-Schritte-Methode. Dabei bindet zuerst ein spezifischer, unmarkierter Primärantikörper an das demaskierte Epitop, danach reagiert ein enzymmarkierter Sekundärantikörper mit dem Primärantikörper. Anschliessend erfolgt die Substrat-Chromogen-Reaktion. Der Vorteil dieser Methode besteht in der hohen Sensitivität (Bönisch, 2003).

In unserem Fall wurde nach der SABC-Methode (Streptavidin-Biotin-Complex) mit dem Dako Duet-Kit (DakoCytomation, Glostrup, Dänemark) gefärbt. Diese basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin für Biotin. Der unkonjugierte Primärantikörper wird mit einem biotinylierten Sekundärantikörper markiert, danach erfolgt die Inkubation mit einem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex (Streptavidin-Biotin-Meerrettichperoxidase). Dieser reagiert schliesslich mit 3, 3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem braunen unlöslichen Endprodukt. Da der Sekundärantikörper von der Ziege stammt, werden die Proben vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mit Normal Goat Serum (NgtS der Firma KPL, Gaithersburg, USA) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

## 6.4. Reaktionsprotokoll

### 6.4.1. Antikörper

Collagen Typ I :	Rabbit anti-Collagen I, polyklonal (600-401-103, Rockland, Philadelphia, USA)
Collagen Typ III :	Mouse anti-Collagen III, monoklonal (031510301, Quartett, Berlin, D)
Collagen Typ IV :	Rabbit anti-Collagen IV, polyklonal (031502601, Quartett, Berlin, D)
$\alpha$ -Actin :	Mouse anti-smooth muscle actin (M 0851, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark)

### 6.4.2. Protokoll

1) Entparaffinierung: Xylol	10 min
Ethanol 100%	5 min
Ethanol 96%	3 min
Ethanol 70%	3 min
2) Aqua dest.	5 min
3) Demaskierung (0.25% Pepsin in 10mM HCl bei 37° C) :	15-120 min
4) Reaktion stoppen mit Aqua dest., 4°C	10 min
5) Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0.5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	20 min
6) Waschen mit Tris buffered saline (TBS)	5 min
7) Präinkubation mit 10% NgTS-TBS	20 min
8) Flüssigkeit abtupfen Coll. I: Blockierung des endogenen Biotins	75 min
9) Inkubation mit Primärantikörper verdünnt in 1% NgTS-TBS bei 24°C	60 min



Negativkontrolle: mouse-/rabbit isotype control

- 10) Waschen mit TBS
- 11) Inkubation mit Sekundärantikörper ( Lsg. C Dako Duet)
  - 1:100 in 1% NgtS-TBS 30 min
- 12) Waschen mit TBS
- 13) Inkubation mit Strept/HRP (Lsg. A + B Dako Duet)
  - 1:100 in TBS 30 min
- 14) Waschen mit TBS
- 15) Inkubation mit DAB 1-3 min
- 16) Waschen mit Aqua dest. 2x5 min
- 17) Gegenfärbung mit Dako Hämatoxylin (S3301) 3 min
- 18) Waschen mit Leitungswasser 5 min
- 19) Dehydratation
  - Ethanol 70% 2 min
  - Ethanol 95% 3 min
  - Ethanol 100% 5 min
  - Xylol 5 min
- 20) Objektträger eindecken mit Pertex (Medite GmbH, Burgdorf, D)

#### 6.4.3. Zusammenstellung der Demaskierungszeiten und Verdünnungen

Antikörper	Demaskierung mit Pepsin-HCl	Verdünnung in NgtS-TBS
Kollagen I	65 min	1:100
Kollagen III	120 min	1:50
Kollagen IV	15 min	1:50
Aktin	Keine	1:100

## 7. Resultate

Die Auswertung der immunhistochemischen Reaktionen erfolgte an einem Lichtmikroskop der Marke Leitz (Dialux 22). Untersucht wurden dabei die Intensität der Reaktion, die Lokalisation der verschiedenen Kollagentypen bzw. des Aktins sowie der Verlauf der zur Darstellung gebrachten Kollagenfasern. Verglichen wurden die drei Uteruskompartimente Endometrium, Myometrium und Perimetrium sowohl innerhalb als auch zwischen den beiden Gruppen von nulli- und multiparen Hündinnen.

### 7.1. Kollagen I und III

Die lichtmikroskopische Untersuchung der immunhistochemischen Reaktion von Kollagen I und III zeigte ein weitgehend identisches Verteilungsmuster und eine ähnliche Lokalisation für beide Kollagene, wobei die Reaktionsintensität von Kollagen III in der Regel stärker war als jene von Kollagen I (Abb. 1b und 1c). Der Nachweis beider Kollagene brachte die Kollagenfasern des Bindegewebes vom Uterusstroma zur Darstellung. Das Verteilungsmuster und die Lokalisation der Reaktionsprodukte von Kollagen I und III werden deshalb anhand von Verlauf, Anordnung und Menge der Kollagenfasern in den verschiedenen Uteruskompartimenten beschrieben.

#### 7.1.1. Nullipare Hündinnen

In der mikroskopischen Uebersicht erschien sowohl bei Kollagen I als auch bei Kollagen III die Reaktion der Fasern im Endo- und Perimetrium intensiver als die der Fasern im Myometrium (Abb. 1a).

In der stärkeren Vergrößerung waren im Stroma des Endometriums unterhalb des negativen Uterusepithels feine, schwach reagierende Kollagenfasern sichtbar. Im Bereich der Drüsen waren sie gröber, stärker angefärbt und grösstenteils längs getroffen. Direkt um die Drüsenendstücke verliefen sie zirkulär und waren dichter gepackt (Abb. 1a und 1b).

Im Stratum circulare des Myometriums verliefen die Kollagenfasern parallel zu den Muskelzellen. Die Reaktionsintensität der einzelnen Fasern war schwächer als im Stratum longitudinale, in welchem sie zwischen den Muskelfaserbündeln dichte, intensiv angefärbte Septen bildeten. Die einzelnen Muskelfasern wurden netzartig von ganz feinen, schwach reagierenden Kollagenfasern umgeben (Abb. 1e).

Das Perimetrium wies eine grosse Anzahl deutlich positiver Kollagen I und III-Fasern auf.

Die Adventitia der Uterusarterien im dünnen, zwischen den beiden Muskelschichten gelegenen Stratum vasculare enthielt stark angefärbte Reaktionsprodukte. Die Intima und Media exprimierten weder Kollagen I noch III.

#### 7.1.2. Multipare Hündinnen

Schon die Uebersicht liess im Vergleich mit den nulliparen Hündinnen bei beiden Kollagentypen eine insgesamt deutlich schwächere Reaktionsintensität, insbesondere des Myometriums, erkennen.

Die stärkere Vergrösserung zeigte im Endometrium unmittelbar subepithelial eine dünne Schicht dichter, deutlich positiver Kollagenfasern. Das tiefer gelegene Stroma enthielt im Vergleich mit den Nulliparen weniger und sehr feine Fasern, die netzartig angeordnet waren. Um die Drüsenanschnitte waren sie wiederum dicker und dichter gepackt (Abb. 1d).

Das Myometrium exprimierte gegenüber den nulliparen Uteri insgesamt weniger Kollagen I und III, insbesondere das Stratum circulare enthielt nur wenige Reaktionsprodukte. Die Septen im Stratum longitudinale waren verglichen mit denjenigen der nulliparen Hündin (Abb. 1e) deutlich dünner, die Reaktion erschien aber gleich intensiv (Abb. 1f).

Im Perimetrium waren wie bei der nulliparen Hündin viele stark angefärbte Kollagenfasern sichtbar.

Das stark verbreiterte Stratum vasculare enthielt deutlich mehr Gefässanschnitte. Die Arterien wiesen eine stark verdickte Intima auf, die von einigen feinen Kollagen I und III-Fasern durchzogen war. Die Media war schmaler und exprimierte kein Kollagen, die Kollagenfasern der Adventitia zeigten eine deutliche Reaktion (Abb. 2a).

## 7.2. Kollagen IV

### 7.2.1. Nullipare Hündinnen

In der Uebersicht erschien das Myometrium stark positiv, Endo- und Perimetrium dagegen nur sehr schwach angefärbt. Die Arterien im Stratum vasculare waren durch die starke Reaktion in der Tunica media deutlich sichtbar

Die stärkeren Vergrößerung liess im Endometrium nur eine schwache Anfärbung der Basalmembranen des Uterusepithels und der Uterusdrüsen erkennen. Die Basalmembranen der im Endometrium gelegenen kleinen Gefässe zeigten hingegen im Allgemeinen eine deutlich positive Reaktion (Abb. 2b).

Die Basalmembranen der glatten Muskelzellen im Myometrium erschienen durch ihre stärkere Reaktion dicker als die übrigen. So wurde die fischzugartige Anordnung der Muskelzellen im Stratum circulare durch die intensive Reaktion des sie umgebenden Kollagen IV deutlich sichtbar. Auch im Stratum longitudinale umgab das Kollagen IV netzartig die einzelnen Muskelfasern (Abb. 2c).

Im Perimetrium war nur schwach eine feine Linie von Kollagen IV sichtbar.

Die Basalmembranen der glatten Muskelzellen der Tunica media der Uterusarterien reagierten ebenfalls stark positiv.

### 7.2.2. Multipare Hündinnen

Die Kollagen IV-Verteilung und die Reaktionsintensität bei den multiparen Hündinnen entsprach in Endo- und Perimetrium jener der nulliparen. Allerdings erschien die Reaktion der Basalmembranen der glatten Muskelzellen im Myometrium schwächer und sie waren teilweise nicht mehr deutlich als Linie erkennbar.

## 7.3. Aktin

### 7.3.1 Nullipare Hündinnen

In der Uebersicht erschien das Endo- und Perimetrium negativ, während das Myometrium eine deutlich positive Reaktion zeigte.

In der stärkeren Vergrösserung zeigte sich im Stroma des Endometriums jedoch eine leichte Hintergrundfärbung. Die Muskelzellen beider Schichten des Myometriums reagierten stark positiv, das Bindegewebe dazwischen war negativ, ebenso das Perimetrium. Die positive Reaktion der glatten Muskelzellen liessen die Tunica media der Uterusarterien breit und stark angefärbt erscheinen, die kaum sichtbare Tunica intima und die Adventitia zeigten keine Antikörperbindung (Abb. 2e).

### 7.3.2. Multipare Hündinnen

Die mikroskopische Uebersicht liess im Endo- und Perimetrium keine Reaktion erkennen. Das Myometrium war von viel Bindegewebe durchzogen und das Stratum vasculare zwischen den beiden Muskelschichten breiter, weshalb es insgesamt schwächer angefärbt erschien.

In der stärkeren Vergrösserung war zu beobachten, dass das Uterusepithel leicht reagierte.

Die Muskelschicht war deutlich dünner als bei der nulliparen Hündin, die Reaktionsintensität der einzelnen Muskelzellen erschien allerdings nur wenig schwächer.

Im Gegensatz zu den nulliparen Hündinnen brachte die Reaktion bei den multiparen im Perimetrium einzelne Muskelfasern zur Darstellung (Abb.2d).

Ein grosser Unterschied zwischen nulli- und multiparen Hündinnen bestand im Wandaufbau der Arterien. Die Tunica media war bei den Multiparen nicht mehr als deutlich abgrenzbare Schicht zu erkennen. Sie war viel schmaler, schwach positiv, und es waren nur noch einzelne Muskelzellen angefärbt. Die Intima war hingegen stark verbreitert. Sie enthielt aber wie auch die Adventitia kein Aktin (Abb. 2f).



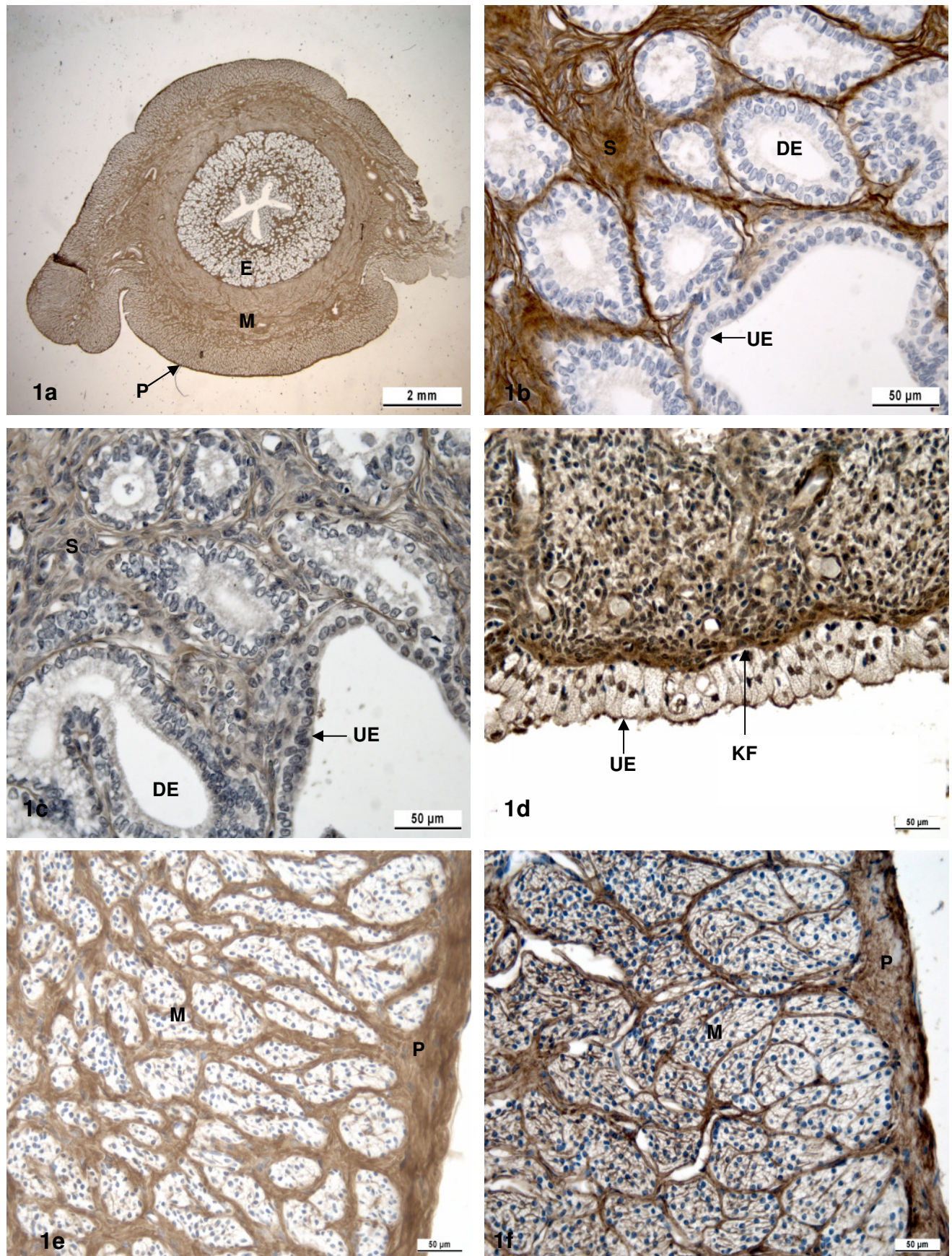


Abb. 1 Immunhistochemische Reaktion von Kollagen Typ I und III im mittleren Bereich von Uterushornquerschnitten null- und multiparer Hündinnen.

**Abbildung 1 Immunhistochemische Reaktion von Kollagen Typ I und III im mittleren Bereich von Uterushornquerschnitten nulli- und multiparer Hündinnen.**

- 1a** Kollagen Typ III in der Uebersicht, nullipare Hündin.  
Die Kollagen III-Fasern des Endo- (E) und Perimetriums (P) reagieren stärker als die des Myometriums (M).
- 1b** Kollagen Typ III im Endometrium einer nulliparen Hündin.  
UE Uterusepithel, DE Drüsenendstück, S Stroma
- 1c** Kollagen Typ I im Endometrium einer nulliparen Hündin.  
Das Verteilungsmuster ist identisch mit demjenigen von Kollagen III, die Reaktionsintensität ist schwächer.
- 1d** Kollagen Typ III im Endometrium einer multiparen Hündin.  
Unmittelbar subepithelial befindet sich eine dünne Schicht dichter, stark positiver Kollagenfasern (Pfeil KF).
- 1e** Kollagen Typ III im Stratum longitudinale des Myometriums (M) und im Perimetrium (P) einer nulliparen Hündin.  
Die Kollagenfasern bilden dichte, intensiv angefärbte Septen zwischen den Muskelfaserbündeln, die einzelnen Muskelfasern sind von feinen, schwach reagierenden Kollagenfasern umgeben. Das Perimetrium enthält viele stark positive Kollagen III-Fasern.
- 1f** Kollagen Typ III im Stratum longitudinale des Myometriums (M) und im Perimetrium (P) einer multiparen Hündin.  
Die Septen zwischen den Muskelfaserbündeln sind deutlich dünner, die Reaktion ist aber gleich intensiv.



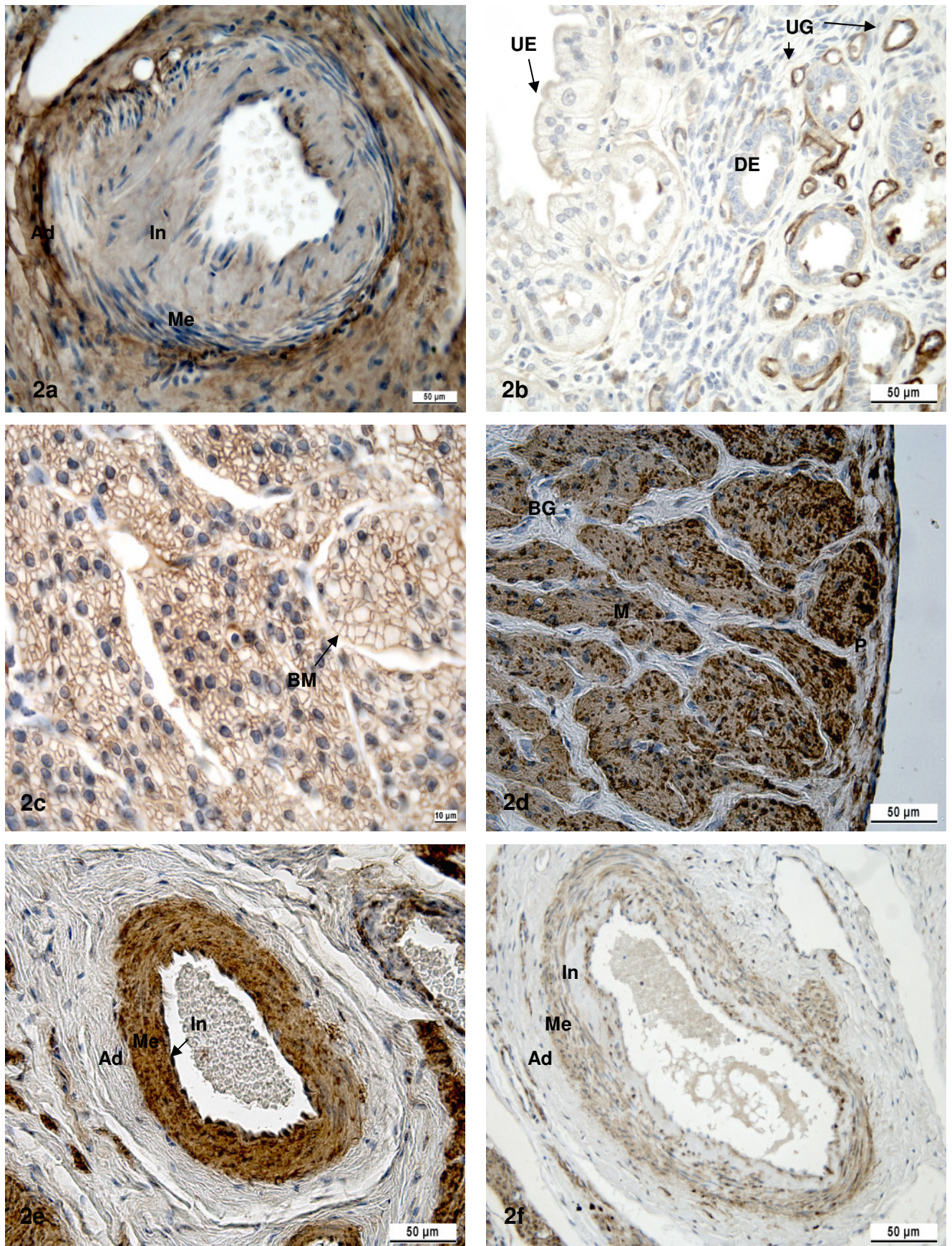


Abb. 2 Immunhistochemische Reaktion von Kollagen Typ III, IV sowie  $\alpha$ -Aktin im mittleren Bereich von Uterusquerschnitten nulli- und multiparar Hündinnen.



**Abbildung 2 Immunhistochemische Reaktion von Kollagen Typ III und IV sowie  $\alpha$ -Aktin im mittleren Bereich von Uterushornquerschnitten nulli- und multiparer Hündinnen.**

- 2a** Kollagen Typ III in der Uterusarteriewand einer multiparen Hündin.  
Die Intima (In) ist stark verdickt und von Kollagenfasern durchzogen. Die Media (Me) ist sehr dünn und exprimiert kein Kollagen III, die Kollagenfasern der Adventitia (Ad) reagieren deutlich positiv.
- 2b** Kollagen Typ IV im Endometrium einer nulliparen Hündin.  
Die Basalmembranen des Uterusepithels (UE) und der Drüsenendstücke (DE) reagieren nur schwach, diejenigen der kleinen Uterusgefäße (UG) hingegen deutlich positiv.
- 2c** Kollagen Typ IV im Myometrium einer nulliparen Hündin.  
Kollagen IV bringt die Basalmembranen der glatten Muskelzellen deutlich zur Darstellung (Pfeil BM).
- 2d**  $\alpha$ -Aktin im Myo- (M) und Perimetrium (P) einer multiparen Hündin.  
Die glatten Muskelzellen reagieren stark positiv. Im Perimetrium sind ebenfalls einige Muskelfasern erkennbar. Das Bindegewebe (BG) enthält keine Reaktionsprodukte.
- 2e**  $\alpha$ -Aktin in der Uterusarterie einer nulliparen Hündin.  
Die Media (Me) ist breit und stark angefärbt. Die Intima (In) ist kaum sichtbar, die Adventitia (Ad) enthält keine Reaktionsprodukte.
- 2f**  $\alpha$ -Aktin in der Uterusarterie einer multiparen Hündin.  
Die Media ist viel schmaler und enthält nur noch einzelne Muskelzellen. Die Intima ist stark verbreitert.

## 8. Diskussion

### 8.1. Methodik

Die Immunhistochemie ist eine präzise Methode, um eine antigene Substanz im Gewebe nachzuweisen und zu lokalisieren. Die Menge oder der Gehalt eines bestimmten Antigens kann damit zwar nicht genau bestimmt, deutliche Unterschiede in der Expressionsintensität und im Verteilungsmuster zwischen verschiedenen Präparaten können aber durchaus semiquantitativ erfasst werden. So konnten beispielsweise Boos et al. (2000) verschiedene Kollagentypen und deren unterschiedliche Expression und Verteilung im Uterus des Rindes während des Zyklus nachweisen.

Damit die Uterusschnitte während des Nachweisverfahrens nicht abgeschwemmt wurden, mussten sie nach dem Schneiden auf Superfrost®plus-Objektträger aufgezogen werden. Diese weisen an der Oberfläche eine elektrische Ladung auf, die mit der Ladung der Präparate interagiert und so eine gute Haftung der Schnitte gewährleistet.

Aus technischen Gründen ist es meist nicht möglich, alle miteinander zu vergleichenden Präparate in einem Durchgang zu färben. Um auswertbare und reproduzierbare Resultate zu erhalten, braucht es deshalb eine äusserst exakte Arbeitsweise und konstante äussere Bedingungen.

Trotzdem kommt es vor, dass sich Präparate im selben Arbeitsgang unterschiedlich stark bzw. unregelmässig anfärben und Hintergrundfärbungen auftreten. Dies ist ein bekanntes Problem in der Immunhistochemie (Bönisch, 2003). Die am häufigsten vorkommenden Ursachen für Hintergrundfärbungen und Unregelmässigkeiten sind hydrophobe, ionische und elektrostatische Wechselwirkungen sowie endogene Enzymaktivität.

In unserem Fall traten die meisten Probleme beim Kollagen I auf, bei dem sich das Epithel ebenfalls leicht anfärbte. Eine mögliche Erklärung könnte das Auftreten von endogenem Biotin sein, welches mit dem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex reagiert (Bönisch, 2003). Allerdings würde man bei dieser Ursache auch bei den anderen Reaktionen dieselbe Hintergrundfärbung erwarten, was nicht der Fall war.

Um diese Ursache auszuschliessen, wurden die Schnitte für die Kollagen I-Reaktion vor der Antikörperzugabe mit einem Avidin-Biotin-Block bzw. mit Magermilchpulver 4%ig in Pufferlösung inkubiert (Rizk et al. 2003). Die Hintergrundfärbung konnte damit auf ein Minimum reduziert werden.

## 8.2. Resultate

### 8.2.1. Kollagen I und III

Sowohl bei der nulliparen als auch der multiparen Hündin kommen Kollagen I und III im Stroma von allen Kompartimenten der Uteruswand vor. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen finden sich vor allem im Endo- und im Myometrium sowie im Wandaufbau der Uterusarterien im Stratum vasculare. Im Endometrium ist bei den Multiparen im Gegensatz zu den Nulliparen unter dem Uterusepithel eine schmale Schicht stark positiv reagierender feiner Kollagen I und III-Fasern sichtbar, welche auf eine Lamina reticularis hinweist. Die Lamina reticularis als variabler Bestandteil der Basalmembran besteht grösstenteils aus retikulären Fasern (Junqueira et al. 2002). Kollagen III ist dabei das vorherrschende Strukturprotein, gefolgt von Kollagen Typ I, V, VI und VII (Evans et al. 2000). Bisher wurde die Lamina reticularis vor allem unter mehrschichtigen Epithelien gefunden (Evans et al. 2000).

Das Auftreten der Lamina reticularis bzw. die vermehrte Expression von retikulären Fasern nach einer Trächtigkeit lässt sich wohl durch die starke mechanische Beanspruchung des Uterus während Trächtigkeit und Geburt erklären.

Im Myometrium findet man bei den multiparen Hündinnen deutlich weniger Kollagen I und III-Fasern als bei den nulliparen, insbesondere im Stratum circulare. Dieser Befund stimmt überein mit der Feststellung von Augsburg und Kürzi (2004), wonach der trächtig gewesene Uterus ein signifikant geringeres relatives Bindegewebesvolumen im Myometrium aufweist. Dies wird durch das grössere Blutgefässvolumen kompensiert. Der trächtig gewesene Uterus der Hündin erfährt auch insgesamt im Gegensatz zu anderen Tierarten keine Volumenveränderung gegenüber dem nicht trächtig gewesenen.

Die immunhistochemische Untersuchung der Uterusgefäße wird in einem eigenen Kapitel diskutiert.

Ursache für das ähnliche Verteilungsmuster von Kollagen I und III ist eine Kopolymerisation der beiden Kollagentypen (Junqueira et al. 2002). In diversen Zellen werden beide Proteine gleichzeitig synthetisiert, was zu der Entstehung von sogenannten Hybridfibrillen führt (Fleischmajer et al. 1990). Diese wurde schon in verschiedensten Geweben nachgewiesen (Fleischmajer et al. 1990). Die allgemein intensivere Anfärbung der Fasern beim Nachweis von Kollagen III im Vergleich zum Kollagen I weist auf einen hohen Anteil von Kollagen III in den Hybridfibrillen hin. Ein Beispiel für Hybridfibrillen sind die retikulären Fasern, welche an der Grenzfläche zwischen Epithel und Bindegewebe respektive Muskulatur feine Netzwerke bilden. Diese sind sehr flexibel und können sich Form- und Volumenveränderungen gut anpassen. Ihre Funktion besteht in der Strukturhaltung von Organen, die eine starke morphologische Flexibilität erfordern. Sie kommen in Arterien, der Darmwand und vor allem auch im Uterus vor (Junqueira et al. 2002).

Neben der Flexibilität ist auch die Zugfestigkeit des Uterusgewebes wichtig, um einen reibungslosen Ablauf von Trächtigkeit, Geburt und Involution zu gewährleisten. Dazu trägt das Kollagen I bei, welches sich durch eine enorm starke Zugfestigkeit auszeichnet. Bei multiparen Hündinnen wäre daher ein vermehrtes Auftreten von Kollagen I-Fasern zu erwarten, was jedoch nicht der Fall war. Es wäre deshalb interessant, das Vorkommen bzw die Expression von Kollagen I im trächtigen Uterus der Hündin zu untersuchen. Möglicherweise wird es zwar während der Trächtigkeit wie beim Rind vermehrt gebildet (Boos et al. 2003), während der Rückbildungsphase aber wieder stark abgebaut.

### 8.2.2. Kollagen IV

Kollagen IV bildet zusammen mit nicht kollagenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix (ECM) wie Proteoglykanen und Glykoproteinen ein dünnes, zähes Blatt, die Basallamina (Alberts et al. 1994). Durch seine besondere Struktur bildet Kollagen IV in der Basallamina ein zweidimensionales Netzwerk, welches ihr die nötige Flexibilität und Widerstandsfähigkeit verleiht (Lodish et al. 2000). Die Basallamina liegt unter allen Epithelien und umgibt einzelne Muskel-, Fett- und Schwannsche

Zellen. Sie erfüllt vielfältige Funktionen: in Nierenglomerula und Lungenalveolen funktioniert sie als hoch selektiver Filter; sie bestimmt die Zellpolarität und beeinflusst Zellmetabolismus, Zelldifferenzierung und Zellmigration (Alberts et al. 1994).

In der Regel besteht die Basallamina aus den beiden Schichten Lamina rara und Lamina densa. Zum Teil wird die Basallamina durch eine Lamina fibroreticularis mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden. Die drei Schichten bilden zusammen die lichtmikroskopisch sichtbare Basalmembran (Alberts et al. 1994).

Die genaue Zusammensetzung der Basallamina variiert von Gewebe zu Gewebe und zum Teil auch innerhalb eines Gewebes (Alberts et al. 1994). Dies ist vermutlich auch der Grund für die Unterschiede in der Expression und Reaktionsintensität von Kollagen IV in den Basallaminae von Uterus- und Drüsenepithelien (schwache Reaktion) sowie Gefäßendothel und glatten Muskelzellen (starke Reaktion).

Zur Expression von Kollagen IV im Uterus und deren Veränderung während des Zyklus und der Trächtigkeit existieren viele zum Teil widersprüchliche Arbeiten. Laut Boos et al. (2000) beeinflusst die Zyklusphase die Verteilung und Organisation von Kollagen IV im Uterus des Rindes. Unter Oestrogeneinfluss war die Basallamina mehr gewellt und wies eine ausgeprägtere Netzstruktur auf als unter Progesterondominanz. Auch im Stroma wurde ein Netzwerk von feinen Fibrillen gefunden, welches in der Oestrogenphase deutlich ausgeprägter war. McIntyre et al. (2002) hingegen stellten zwischen dem 18. und 30. Tag einer Trächtigkeit beim Rind unter Progesterondominanz eine verstärkte Expression von Kollagen IV fest. Das Profil der Basallamina des Uterusepithels ändert sich dabei zwischen dem 20. und 29. Tag von gerade zu gebogen (King et al. 1980).

Bei der Ziege verschwindet das Kollagen IV zwischen Tag 15 und 21 ganz aus Basallamina und subepitheliale Stroma (Guillomot et al. 1999), während bei der Ratte der Kollagen IV –Gehalt bis zum 21. Tag tief bleibt und dann die letzten 2 Tage dramatisch ansteigt (Shynlova et al. 2004). Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Tierarten ist allerdings durch die unterschiedliche Zyklus- und Trächtigkeitsdauer wenig aussagekräftig und nur bedingt sinnvoll.

Zu der Expression von Kollagen IV während Zyklus und Trächtigkeit der Hündin existieren noch keine Arbeiten. Unsere Resultate zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die Reaktionsintensität von Kollagen IV erschien bei multiparen Hündinnen nur leicht schwächer als bei nulliparen.

### 8.2.3. $\alpha$ -Aktin

Als Bestandteil der glatten Muskelzellen kommt  $\alpha$ -Aktin vor allem im Myometrium und in der Tunica media der Arterienwände vor, welche bei der nulliparen Hündin stark positiv reagieren. Bei den Multiparen ist die Muskulatur vermehrt von Bindegewebe durchzogen, die einzelnen Muskelzellen scheinen im Vergleich zu denjenigen der Nulliparen aber nicht weniger  $\alpha$ -Aktin zu enthalten.

Aktin kommt gewebespezifisch in mindestens 6 verschiedenen Isoformen vor (Vanderkerckhove et al. 1978). Glatte Muskulatur enthält typischerweise die Isoformen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin (North et al. 1994).

Zyklus und Trächtigkeit haben laut Riley et al. (2005) und Shynlova et al. (2005) keinen Einfluss auf die Expression von  $\alpha$ -Aktin. Laut Wang et al. (2000) kann allerdings mechanischer Stress, zum Beispiel durch eine Trächtigkeit, zu einer verringerten Expression von  $\alpha$ -Aktin sowie einem Abbau von  $\alpha$ -Aktin-Filamenten in den Gefässwänden (Goldman et al. 2003) führen.

Die Expression von  $\gamma$ -Aktin steigt während der zweiten Trächtigkeitshälfte signifikant an (Shynlova et al. 2005). Dies scheint für die optimale Kontraktilität des Myometriums während der Geburt wichtig zu sein, während das  $\alpha$ -Aktin offenbar keine Rolle spielt (Shynlova et al. (2005)). Dies könnte erklären, warum wir keine signifikanten Unterschiede im  $\alpha$ -Aktin-Gehalt der glatten Muskelzellen zwischen den beiden Gruppen gefunden haben.

### 8.2.4. Gefässe

Laut Augsburg und Kürzi (2004) erscheint das Stratum vasculare des Myometriums nach 7 durchgemachten Trächtigkeiten stark verdickt und enthält im Vergleich zu nicht trächtig gewesenen Uteri deutlich mehr und grössere Gefässanschnitte. Bei den grösseren Arterien findet man zwischen nulli- und multiparen Hündinnen auch grosse Unterschiede im Wandaufbau. Die Tunica intima ist bei Multiparen infolge vermehrter Einlagerung von extrazellulären Matrixsubstanzen deutlich verdickt. Die glatte Muskulatur bzw. die Mediadicke ist dagegen stark reduziert und die Membrana elastica verbreitert und aufgelockert. Die Arterienwand ist insgesamt signifikant verdickt. Man spricht hier von einer sogenannten Trächtigkeitssklerose. Diese ist bei der Hündin im Gegensatz zu andern Säugetieren schon nach einer Trächtigkeit voll

ausgeprägt (Augsburger und Kürzi, 2004). Die Trächtigkeits- resp. Graviditätssklerose ist auch beim Menschen sowie diversen Tierarten wie Rind (Mochow and Olds, 1993), Schwein (Lansing, 1926; Richter, 1936; Friemann, 1939), Pferd (Grüninger et al. 1998), kleinen Wiederkäuern (Behne, 1929), Meerschweinchen (Albert and Bhussry, 1967) sowie beim Japanischem Serrau (Kita et al. 1996) beschrieben.

Ein Ziel der Arbeit war es, die extrazelluläre Matrixsubstanz der verdickten Intima zu bestimmen, die sich laut Augsburger und Kürzi (2004) in der Trichromfärbung wie Bindegewebe anfärbte. Laut Haudenschild (2005) ist die Intimahyperplasie bei der Frau fibrozellulärer Natur und besteht aus Myofibroblasten, Kollagen und Glykosaminoglykanen. Wir haben allerdings in der Intima multiparer Hündinnen nur vereinzelte Kollagen I und III-Fasern gefunden. Aktin wurde nicht exprimiert, was gegen das Vorhandensein von Myofibroblasten spricht. Bei der Hündin sind demzufolge noch andere Substanzen der extrazellulären Matrix an der Verdickung der Intima beteiligt.

Beim Menschen kommt es bei den Uterusarterien durch den temporär erhöhten Bedarf an Blut während der Schwangerschaft zu einem vermehrten Blutdurchfluss. Dies führt zu der Verdickung der Intima. Im Gegensatz dazu führt bei einer Arteriosklerose der erhöhte Druck vor allem zu einer Verdickung der Media (Haudenschild 2005). Im Unterschied zu den sklerotisch veränderten Arterien verfetten die Uterusarterien bei der Frau nie und kalzifizieren auch sehr selten (Haudenschild 2005).

Post Partum kontrahieren sich die Uterusarterien der Frau bis fast zum Verschluss und produzieren bei einer nächsten Schwangerschaft eine neue Schicht extrazellulärer Matrix in der Intima. Deshalb bilden sich beim Menschen im Gegensatz zum Hund sogenannte Jahresringe (Haudenschild 2005), anhand derer man eine Aussage über die Anzahl der Schwangerschaften machen kann. Dies ist auch beim Rind und Schwein (Höfliger, 1954), nicht aber beim Hund möglich (Augsburger und Kürzi, 2004).

Beim Pferd korreliert der Schweregrad der Veränderungen der Uterusarterien mit der Anzahl durchgemachter Trächtigkeiten (Kriesten, 1995; Grüninger et al. 1998). Bei multiparen Stuten kommt es zu einer Zerreissung der Membrana elastica interna, die

Media atrophiert und kalzifiziert, die Intima hypertrophiert. Die dadurch bedingte verminderte Fähigkeit der Gefässe zur Anpassung an die Bedürfnisse bei einer Trächtigkeit kann zu Infertilität führen (Grüniger et al. 1998). Allerdings treten auch bei nie trächtig gewesenen Stuten mit zunehmendem Alter vermehrt sklerotische Veränderungen an den Uterusarterien auf (Schoon et al. 1994; Grüniger et al. 1998).

In unserem Fall zeigte keine der nulliparen Hündinnen sklerotische Veränderungen an den Uterusgefässwänden. Da die Untersuchung bei diesen Tieren im jugendlichen Alter von 20 bis 27 Monaten erfolgte, waren auch keine altersbedingte Veränderungen der Uterusgefässe zu erwarten. Ob mit zunehmenden Alter ähnliche Veränderungen der Uterusarterien bei nulliparen Hündinnen wie bei der nulliparen Stute auftreten, kann nicht beantwortet werden.

### **8.3. Schlussfolgerungen**

1. Das nahezu identische Verteilungsmuster von Kollagen Typ I und III lässt darauf schliessen, dass sich die kollagenen Bindegewebsfasern des Uterusstromas aus Hybridfibrillen zusammensetzen, die aus Kollagen Typ I und III bestehen. Die stärkere Anfärbung der Kollagenfasern bei der Kollagen III-Reaktion weist auf einen hohen Kollagen III-Anteil hin.
2. Die unterschiedliche Reaktion der Basalmembranen von Uterus- und Drüsenepithel einerseits sowie von Uterusgefässen und glatten Muskelzellen andererseits beim Nachweis von Kollagen Typ IV ist auf die variierende Zusammensetzung der Basallaminae in verschiedenen Geweben zurückzuführen.
3. Die grosse mechanische Belastung des gesamten Uterus sowie der vermehrte Blutdurchfluss durch die Uterusarterien während einer Trächtigkeit führen zu der sogenannten Trächtigkeitssklerose. Diese ist durch eine massive Verdickung der Tunica intima und eine starke Reduktion der glatten Muskulatur der Tunica media gekennzeichnet.



4. Abgesehen von den sklerotisch veränderten Uterusarterien, der auftretenden Lamina fibroreticularis des Uterusepithels und den dünneren Bindegewebssepten im Stratum longitudinale des Myometriums bei multiparen Hündinnen bestehen zwischen nulliparen und multiparen Hündinnen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Verteilung, Lokalisation und Reaktionsintensität von Kollagen Typ I, III und IV und  $\alpha$ -Aktin. Dies lässt den Schluss zu, dass sich trotz der starken Auf-, Um- und Abbauvorgänge während der Trächtigkeit und anschliessenden Involution der trächtig gewesene Uterus bezüglich der untersuchten Kollagentypen und des  $\alpha$ -Aktins nur geringfügig vom nicht trächtig gewesenen unterscheidet.

## 9. Literaturverzeichnis

Al-Bassam M. A., Thomson R. G., O'Donnell L. (1981)

Normal postpartum involution of the uterus in the dog.

Can. J. comp. Med. 45: 217-232

Albert E. N., Bhussry B. R. (1967)

The effects of multiple pregnancies and age on the elastic tissue of uterine arteries in the guinea pig.

Am. J. Anat. 121: 259-270

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1994)

Molecular biology of the cell.

Garland Publishing, Inc., New York

pp. 988-992

Augsburger H. R., Kürzi M. (2004)

Histomorphologic and morphometric evaluation of the uterine horns in nulliparous and multiparous beagles.

Am. J. Vet. Res. 65: 552-558

Augsburger H. R., Eggenberger M. (2005)

Histochemical and stereological analysis of the levator ani (pubocaudal) muscle in nulliparous and multiparous beagles.

Theriogenology 64: 144-154

Barrau M. D., Abel J. H., Verhage H. G., Tietz W. J. (1975)

Development of the endometrium during the oestrus cycle in the bitch.

Am. J. Anat. 142: 47-65

Behne W. (1929)

Pathologisch-histologische Untersuchungen über die Wandveränderungen der Uterusgefäße trächtig gewesener Schafe.

Dissertation med. vet., Leipzig

Boenisch T. (2003)

Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden.

DakoCytomation Corp. Carpinteria, CA, USA

Boos A. (2000)

Immunohistochemical assessment of collagen types I, III, IV and VI in biopsy samples of the bovine uterine wall collected during the oestrus cycle.

Cells Tissues Organs 167: 225-238

Boos A., Stelljes A., Kohtes J. (2003)

Collagen types I, III and IV in the placentome and interplacentomal maternal and fetal tissues in normal cows and in cattle with retention of fetal membranes.

Cells Tissues Organs 174: 170-183

De Bruyn-Outboter E. (1911)

Ueber die Strukturverhältnisse des juvenilen und gravid gewesenen Uterus der Carnivoren, *Canis familiaris* und *Felis domestica* und von *Lepus cuniculus* mit spezieller Berücksichtigung der bleibenden, für den Nachweis einer bereits vorhanden gewesenen Trächtigkeit wichtigen anatomischen Merkmale.

Dissertation med. vet., Bern

Evans M. J., Van Winkle L. S., Fanucchi M. V., Luck E. C., Sannes P. L., Plopper C. G. (2000)

Three-dimensional organization of the lamina reticularis in the rat tracheal basement membrane zone.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 22: 393-397

Eyre D. R., Eyre D., Schurmann D. J. (2004)

Collagens and cartilage matrix homeostasis.

Clin. Orthop. 427: 118-122

Fleischmajer R., Perlish J. S., Burgeson R. E., Shaikh-Bahai F., Timpl R. (1990)

Type I and type III collagen interactions during fibrillogenesis.

Am. N. Y. Acad. Sci. 580: 161-175

Frewein J., Vollmerhaus B., Sinovatz F., Amselgruber W. (1994)

Anatomie von Hund und Katze.

Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin

pp. 231-234

Friedrich R. E., Bartel-Friedrich S., Plambeck K. (2000)

The presence of collagen III and IV in experimental microsurgical anastomoses of arteries.

J. Oral Maxillofac. Surg. 58: 1125-1128

Friemann F. K. (1939)

Zur klinisch-anatomischen Unterscheidung juveniler und gravid gewesener Schweineuteri.

Dissertation med. vet., Hannover

Goldman J., Zhong L., Liu S. Q. (2003)

Degradation of alpha-actin filaments in venous smooth muscle cells in response to mechanical stretch.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 284: H1839-H1847

Grüninger B., Schoon H.-A., Schoon D., Menger S., Klug E. (1998)

Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mares in relationship to age and parity.

J. Comp. Path. 119: 293-309

Guillomot M. (1999)

Changes in extracellular matrix components and cytokeratins in the endometrium during goat implantation.

Placenta 20: 339-345

Haudenschild C. C. (2005)

Personal communication

Hickey M., Pillai G., Higham J. M., Sullivan M., Horncastle D., Doherty D., Stamp G. (2003)

Changes in endometrial blood vessels in the endometrium of women with hormone replacement therapy-related irregular bleeding.

Human Reproduction 18: 1100-1106

Höfliger H. (1954)

Der Nachweis stattgehabter Trächtigkeiten bei Rind und Schwein.

Schweiz. Arch. Tierheilk. 96: 635-641

Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R. O. (2002)

Histologie.

Springer Verlag, Berlin

pp. 151-159; 238-240

Kaidi R., Brown P. J., David J. S. E., Etherington D. J., Robins S. P. (1995)

Uterine collagen during pregnancy in cattle.

Vet. Res. 26: 87-91

King G. J., Atkinson B. A., Robertson H. A. (1980)

Development of the bovine placentome from days 20 to 29 of gestation.

J. Reprod. Fertil. 59: 95-100

Kita I., Suzuki N., Niwa N., Tsubota T. (1996)

Gravid sclerosis in the myo- and endometrial vessels of the japanese serow, *Capricornis crispus*, with spezial reference to past gestations.

Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 1: 113-117

Kriesten H. (1995)

Zur prognostischen Bedeutung von Angiopathien im Rahmen der Kategorisierung von Endometriumsbiopsien bei Stuten.

Dissertation med. vet., Hannover

Kürzi M. (2003)

Histomorphologische und morphometrische Untersuchungen der Uterushörner nulliparar und multiparer Hündinnen.

Dissertation med. vet., Zürich

Lansing W. (1926)

Pathologisch-anatomische Untersuchungen über die sogenannte Graviditätssklerose der Uterusgefäße beim Schwein.

Dissertation med. vet., Leipzig

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. (2000)

Molecular Cell Biology. 4<sup>th</sup> Edition

WH Freeman & Company, New York

pp. 979-985

MacIntyre D. M., Lim H. C., Ryan K., Kimmins S., Small J. A., MacLaren L. A. (2002)

Implantation-associated changes in bovine uterine expression of integrins and extracellular matrix.

Biol. Reproduction 66: 1430-1436

Mc Entee K. (1990)

Reproductive Pathology of Domestic Mammals.

Academic Press, Inc. San Diego, California

pp. 137-139

Mochow R., Olds D. (1966)

Effects of age and number of calves in histological functions of the bovine uterus.

J. Dairy Sci. 49: 642-646

Neider C. (1957)

Zur Gefäßversorgung des Hundeuterus nebst Angioarchitektur seiner Wandabschnitte.

Dissertation med. vet., Berlin

Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1999)

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band II, 8. Auflage

Parey Buchverlag, Berlin

pp. 398-404; 415-419

North A. J., Gimona M., Lando Z., Small J. V. (1994)

Actin isoforms compartments in chicken gizzard smooth muscle cells.

J. Cell Sci. 107: 445-455

Oswald M. (2005)

Immunhistochemische Untersuchung der Kollagentypen I, III und IV sowie von  $\alpha$ -Aktin in der Urethra von kastrierten und sexuell intakten Hündinnen.

Dissertation med vet., Zürich (in Begutachtung)

Richter R. (1936)

Beitrag zur Kenntnis des juvenilen und gravid gewesenen Uterus des Schweines.

Dissertation med. vet., Leipzig

Riley M., Wu X., Baker P. N., Taggart M. J. (2005)

Gestational-dependent changes in the expression of signal transduction and contractile filament-associated proteins in mouse myometrium.

J. Soc. Gyn. Invest. 12: 33-43

Rizk D. E. E., Mensah-Brown E. P., Chandranath S. I., Shafiullah I. A. M., Al-Haj M.

P. M., Adem A. (2003)

Effects of ovariectomy and hormone replacement on collagen and blood vessels of the urethral submucosa of rats.

Urol. Res. 31: 147-151

Salomon F.-V., Geyer H., Gille U. (2004)

Anatomie für die Tiermedizin.

Enke Verlag, Stuttgart

pp. 383-386

Sarges J., Heuwieser W., Schlüns J., Drewes B. (1998)

Immunohistological examination on the distribution of collagen types I, III, IV and V in bovine post partum placentomes.

J. Vet. Med. A 45: 1-10

Schnorr B., Kressin M. (2001)

Embryologie der Haustiere, 4. Auflage

Enke Verlag, Stuttgart

pp. 26; 100-103; 185-188

Shynlova O., Mitchell J.A., Tsampalieros A., Langille B. L., Lye S. J. (2004)

Progesterone and gravidity differentially regulate expression of extracellular matrix components in the pregnant rat myometrium.

Biol. Reprod. 70: 986-992

Shynlova O., Tsui P., Dorogin A., Chow M., Lye S. J. (2005)

Expression and localization of alpha-smooth muscle and gamma-actins in pregnant rat myometrium.

Biol. Reprod., in press

Schoon D., Schoon H.-A., Klug E. (1994)

Angiopathien im Endometrium der Stute: Diagnose und prognostische Bedeutung.

13. Fachtagung der Fachgruppe Pferdekrankheiten der DVG, Wiesbaden, D

pp. 17-29

Srivastava A., Tischler A. S., Delellis R. A. (2004)

Endogenous biotin staining as an artifact of antigen retrieval with automated immunostaining.

Endocrine Pathology 15: 175-178

Vandekerckhove J., Weber K. (1978)

At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide.

J. Mol. Biol. 126: 783-802



Wang J., Seth A., McCulloch C. A. (2000)  
Force regulates smooth muscle actin in cardiac fibroblasts.  
Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H2776-H2785

## 10. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die in irgendeiner Form zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen und mich während dieser Zeit unterstützt haben.

Insbesondere ein grosses Dankeschön an:

Herrn PD Dr. H. Augsburg für die Ueberlassung des Themas, die Uebernahme des Referats und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. F. Ehrensperger für die Uebernahme des Korreferates.

Frau J. Leclerc für die wertvolle fachliche Unterstützung im Labor und Ihre immerwährende gute Laune.

Frau J. Peter für die Ueberarbeitung der Bilder.

Frau M. Balushev für Ihre Mithilfe bei Computerproblemen.

Frau A. Marcantonio von der Firma Novartis für die vielen wertvollen Tips zur Kollagenfärbung.

Herrn Dr. M. Barton und Herrn Prof. Dr. C. Haudenschild für die prompte und hilfreiche Beantwortung der Fragen zur Arteriosklerose.

Frau Dr. M. Räber und Frau I. Weingart für die vielen konstruktiven Ratschläge und die gute Stimmung im Büro.

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt und motiviert haben.

Allen Freunden und Kollegen, insbesondere Rudolf Pfeiffer, für die unendliche Geduld und aufmunternden Worte.

## Lebenslauf

Name	Daniela Henzi
Geburtsdatum	26. September 1977
Geburtsort	Wetzikon ZH
Nationalität	CH
Heimatort	Zürich und Günsberg SO
1984-1990	Primarschule in Hombrechtikon ZH
1990-1997	Kantonsschule Zürcher Oberland, Wetzikon
1997	Mittelschulabschluss, Maturität Typus D
1997-2002	Studium der Veterinärmedizin Universität Zürich
2000	Austauschsemester an der Università degli studi di Parma, Italien
2002	Eidgenössisches Diplom der Veterinärmedizin an der Universität Zürich
2003-2004	Assistentin in der Gross- und Kleintierpraxis Dr. M. Bischoff, Sent GR
Seit 2004	Assistentin in der Gross- und Kleintierpraxis Peter Hofer, Wolfhausen
2005	Dissertation am Veterinäranatomischen Institut Vetsuisse-Fakultät Zürich

16. November 2005